

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

PRIMJENA GENSKE TERAPIJE KOD HEMOGLOBINOPATIJA

APPLICATION OF GENE THERAPY IN
HEMOGLOBINOPATHIES

SEMINARSKI RAD

Ana Vujić

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Petra Korać

Zagreb, 2017.

Sadržaj

1. Uvod	2
2. Hemoglobinopatije	3
2.1. Srpasta anemija	3
2.2. Talasemije	4
3. Genska terapija kod hemoglobinopatija	5
3.1. Ugradnja globinskih gena	6
3.2. Klinička istraživanja	10
3.3. Uređivanje globinskih gena i globinskih regulacijskih elemenata	12
4. Zaključak	16
5. Literatura	17
6. Sažetak	20
7. Summary	20

1. Uvod

Globini su velika porodica proteina koji imaju sličnu primarnu i tercijarnu strukturu. Tetramerni hemoglobin je zaslužan za transport kisika u krvi. Danas je poznato 500 genskih varijanti hemoglobina koje se prirodno pojavljuju u ljudskoj populaciji (Nelson, Cox i Lehninger, 2013). Izraz hemoglobinopatije obuhvaća sve poremećaje koji narušavaju funkciju hemoglobinskih gena. Hemoglobinopatije su među najčešćim nasljednim bolestima u svijetu (Kohne 2011). Budući da su mutacije koje uzrokuju hemoglobinopatije većinom točkaste mutacije, to ih čini primarnim ciljem za gensku terapiju (Goodman i Malik 2016).

Genska terapija je relativno nova paradigma u medicini sa znatnim terapijskim potencijalom te je od prvog kliničkog istraživanja doživjela znatan napredak. Koncept genske terapije je vrlo jednostavan: funkcionalna kopija promijenjenog gena se unosi u stanicu kako bi omogućila funkciju koja nedostaje. To se može postići transferom gena *in vivo* gdje se vektor koji nosi funkcionalnu kopiju gena direktno unese u tijelo. Transfer gena se može postići i *ex vivo*, prijenosom u stanice koje su uzete iz pacijenta. Genetski modificirane stanice se zatim transplantiraju nazad u pacijenta. No, uz insercijsku mutagenezu, imunološki odgovor na transplantat čini glavnu prepreku u genskoj terapiji. (Ginn i sur. 2013, Herzog i sur. 2013). Prva uspješna genska terapija kod ljudi primijenjena je 1990. godine kod dviju djevojčica s teškom kombiniranom imunodeficijencijom korištenjem retrovirusnog vektora (Blaese i sur. 1995). Većina kliničkih ispitivanja je usmjerena na kardiovaskularne bolesti, maligne bolesti i nasljedne monogenske bolesti u koje spadaju i hemoglobinopatije. Kod tretiranja monogenih bolesti genskom terapijom, funkcionalna kopija gena se unosi u matične stanice koje se dijele. Naime, takve genetski modificirane matične stanice diobom prenose funkcionalnu kopiju gena i na stanice kćeri, što omogućava trajno ispravljanje poremećaja (Ginn i sur. 2013).

2. Hemoglobinopatije

Hemoglobin je heterotetramer kojeg čine dvije podjedinice iz α -globinske potporodice i dvije podjedinice iz β -globinske potporodice. Ekspresija različitih podjedinica α - i β -globinskih porodica je proces reguliran razvojem (Goodman i Malik 2016). Odrasli imaju dva tipa hemoglobina: HbA i HbA₂. Kod fetusa je glavna hemoglobinska komponenta HbF. Svi oblici sadrže α -globinski lanac, a kao drugu podjedinicu kod HbA nalazimo β -globinski lanac, kod HbA₂ δ -globinski lanac, a kod HbF γ -globinski lanac (Stamatoyannopoulos 1972). Mutirani globinski proteini ili njihova smanjena ekspresija može dovesti do oslabljene opskrbe kisikom (Goodman i Malik 2016). Kliničke manifestacije bolesti su vrlo varijabilne, od blage hipokromne anemije do ozbiljne anemije ovisne o cjeloživotnoj transfuziji. Dijelev se u dvije glavne grupe: strukturne varijante hemoglobina i talasemije (Kohne 2011).

2.1. Srpasta anemija

Srpasta anemija posljedica je točkaste mutacije u β -globinskom genu zbog koje dolazi do transverzije adenina u timin, što uzrokuje supstituciju glutaminske kiseline valinom na šestom mjestu β -globinskog lanca. Mutirani β -globinski lanac označava se sa β^s , a hemoglobin koji sadrži dva takva mutirana β -globin peptida naziva se HbS. Kod deoksigenacije HbS-a globinske molekule se smataju i nižu jedna do druge u niti nalik kunicama, niti se slažu u snopiće, a snopići precipitiranog hemoglobina izobličie eritrocite u tvorbe koje na krvnom razmazu sličie srp. Izobličieni eritrociti začepļuju krvne žile i izazivaju mikroinfarkte u kostima šake, stopala i u parenhimskim organima te mozgu (Goodman i Malik 2016, Mardešić i sur. 2003). Kao simptomi se javļaju još i kronična hemolitička anemija i aplastične krize s ozbiljnom anemijom. Pacijenti su također podložni infekcijama. Liječenje kod srpaste anemije jest alogenska transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (HSC, od eng. *hematopoietic stem cells*), ali ona je moguća samo kod djece mlađe od 16 godina i ako postoji odgovarajući donor. Kod većine pacijenata se provodi simptomatski tretman koji obuhvaća liječenje antibioticima, analgeticima, hidroksiureom, transfuzijskom terapijom uz obaveznu helacijsku terapiju i dr. (Kohne, 2011)

2.2. Talasemije

Talasemije obuhvaćaju poremećaje u sintezi hemoglobina te spadaju u najčešće monogenske poremećaje u svijetu. Dije se na α - i β -talasemije. α -talasemije se javljaju kao posljedica poremećene sinteze α -globinskog lanca koja je rezultat delecija ili rjeđe mutacija dva ili više od mogućih četiri α -globinskih gena. Delecije mogu biti parcijalne (α^+) ili potpune (α^0). Gubitak α -globinskih lanaca dovodi do redukcije dominantnog hemoglobina A (Goodman i Malik 2016, Kohne 2011). Ovisno o broju gena pogođenih gubitkom funkcije postoje četiri kliničke slike α -talasemije: α -talasemija minima (heterozigotna α^+ talasemija), α -talasemija minor (heterozigotna α^0 -talasemija ili homozigotna α^+ - talasemija, HbH-bolest (složeni heterozigot α^+/α^0 talasemija s tri inaktivna α -globinska gena) i hemoglobinski Bartov fetalni hidrops kod kojeg je prisutna delecija u sva četiri α -globinska gena, što je letalno i završava kao hidrops fetusa (Kohne 2011, Mardešić i sur. 2003).

β -talasemije su posljedica poremećene sinteze β -globinskih lanaca koje su najčešće rezultat točkastih mutacija u β -globinskom genu. Postoji tisuće različitih mutacija koje utječu na različite procese i razine u sintezi β -globina kao što su transkripcija, translacija, mRNA procesiranje i stabilnost RNA. Mutacije mogu rezultirati djelomičnim (β^+) ili potpunim nedostatkom (β^0) stvaranja β -globinskih lanaca. Niski sadržaj β -globina dovodi do suviška α -globinskih lanaca koji precipitiraju u eritroidnim prekursorima. α -globinski agregati oštećuju membrane eritroidnih prekursora i uzrokuju njihovu ranu smrt, stoga je eritropoeza neefektivna (Goodman i Malik 2016, Kohne 2011). Prvi znakovi β -talasemije se javljaju 6-12 mjeseci nakon rođenja kada se fetalni hemoglobin (HbF) zamjenjuje s adultnim hemoglobinom (HbA). Naime, kod fetalnog hemoglobina dominantni eksprimiran globin je γ -globin iz β -globinske obitelji. Postoje tri različite kliničke slike β -talasemije, a to su: talasemija minor (heterozigotna β -talasemija), talasemija intermedia (blaga homozigotna ili kombinirana heterozigotna β -talasemija) i talasemija major (ozbiljna kombinirana heterozigotna ili homozigotna β -talasemija). Talasemija major je dugoročno anemija ovisna o transfuziji koja se liječi primjenom eritrocitnih koncentrata te helirajućih spojeva koji vežu željezo u topljive komplekse, što se izlučuje mokraćom. Kao i kod srpaste anemije, liječenje β -talasemije major jest alogenska transplantacija HSC-a ako postoji odgovarajući donor (Goodman i Malik 2016, Kohne 2011, Mardešić i sur. 2003).

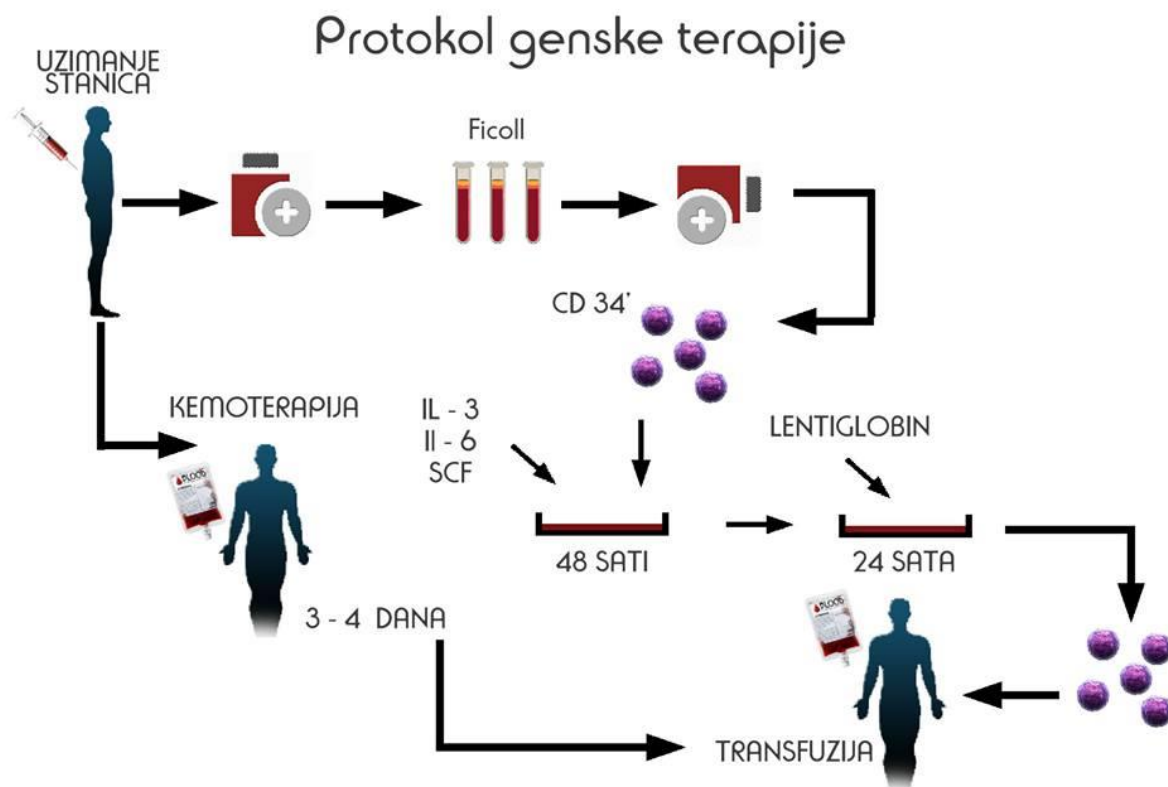
3. Genska terapija kod hemoglobinopatija

Genska se terapija hemoglobinopatija detaljno istražuje. Genetski modificirane transplantirane HSC mogu prenositi modificirani genom na stanice kćeri uključujući i prekursore eritrocita. Također, većina mutacija koje uzrokuju hemoglobinopatije su točkaste mutacije koje dopuštaju efikasniju korekciju gena. Postoje dva generalna pristupa za osiguravanje normalne β -globinske funkcije genskom terapijom: korekcija DNA aberacija u β -globinskom genu homolognom rekombinacijom ili ugradnja normalnog β -globinskog gena u genom. Iako korekcija gena pokazuje veliku prednost radi održavanja β -globinskog gena u nativnom kromosomskom okruženju, ugradnja gena je preferiran pristup, zato što je frekvencija homologne rekombinacije preniska (Bank 2010, Goodman i Malik 2016).

Tradicionalna genska terapija u kliničkim istraživanjima se provodi ugradnjom dodatnih globinskih gena putem lentivirusnog vektora koji se integrira u genom stanice domaćina. Stanice domaćina u ovom slučaju su HSC uzete iz periferne krvi, krvi pupčane vrpce ili koštane srži pacijenta koje se nakon izlaganja terapiji transplantiraju nazad u pacijenta gdje mogu proliferirati (Slika 1.). Buduća klinička ispitivanja bi kao domaćinske stanice mogla koristiti inducirane pluripotentne matične stanice (Goodman i Malik 2016). Ono što je gensku terapiju za β -hemoglobinopatije učinilo ostvarivom jest identifikacija kritičnih regulacijskih elemenata koji su potrebni za visoku ekspresiju β -globinskog transgena. Regulacijski elementi se nalaze 40 do 60 kb uzvodno od β -globinskog gena u lokusu kontrolne regije (LCR, od eng. *locus control region*), a predstavljaju eritroidne specifične pojačivače koji su potrebni za visoke razine ekspresije β -globinskih gena. LCR se sastoji od 5 hipersenzitivnih mjesta za DNazu I (HS1 – HS5) koji čine ovu regiju iznimno osjetljivom na razgradnju DNazom I. (Candrakasan i Malik 2014, Li i sur. 2002).

Nove pristupe genskoj terapiji otvorila je identifikacija kritičnih elemenata uključenih u represiju γ -globina koji se mogu iskoristiti u genskoj terapiji s ciljem povećanja razine HbF-a. Naime, povećane razine HbF-a znatno ublažavaju fenotip srpaste anemije i β -talasemije. U fetalnom životu dominantno eksprimiran gen u β -globinskom lokusu jest γ -globinski gen dok je ekspresija β -globinskog gena suprimirana. Nakon rođenja, ekspresija γ -globina pada do neznatne razine, a ekspresija β -globina se naglo povećava, što dovodi do smanjenja razine HbF-a i povećanja razine HbA. Ove tempirane promjene u ekspresiji gena odvijaju se unutar

klastera nalik β -lancu na kromosomu 11 koji ima pet funkcionalnih gena (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ , β), a regulirane su s više transkripcijskih faktora kao što su GATA1, BCL11A, KLF1, MYB, SOX6 i modifikacijama s histonskim deacetilazama 1 i 2 (Chandrakasan i Malik, 2014).



Slika 1. Ljudska lentiglobinska genska terapija. Stanice koštane srži su uklonjene i pročišćene gradijentom FicoII i izlaganjem anti-CD34 antitijelima. CD34⁺ su inkubirane s faktorima rasta, uključujući interleukin 3, trombopoetin, ligand Flt3i faktor matičnih stanica, na 24 h do 48 h. Zatim su izložene Lentiglobinu, virusu koji sadrži ljudski β -globinski gen tijekom 24 h. Dok su stanice procesirane, koštana srž pacijenta je izložena ablaciji kemoterapijom. Genski modificirane stanice su zatim intravenoznom transfuzijom unesene u pacijenta (Prilagođeno na temelju Bank 2010).

3.1. Ugradnja globinskih gena

Ugradnja globinskih gena zahtjeva integraciju u genom stanice domaćina. Preduvjeti potrebni za uspješnost ove vrste terapije zahtijevaju visoko efikasni transfer gena, visoku

razinu primanja presatka, visoku ekspresiju β/γ -globinskih gena, konzistentnu ekspresiju neovisnu o poziciji i mjestu integracije, sigurnu ekspresiju s malo ili bez rizika za insercijsku mutagenezu/onkogenezu te ekspresiju β -globinskog gena specifičnu za razvojni stadij i eritroidnu liniju. (Chandrakasan i Malik 2014, Goodman i Malik 2016). Vektori koji se trenutno koriste u kliničkim ispitivanjima su retrovirusni (RV, od eng. *retrovirus*), lentivirusni (LV, od eng. *lentivirus*) i pjenasti virusni vektori (FV, od eng. *foamy virus*) čija je usporedba prikazana u tablici 1. Ovi virusni vektori su bioinženjeringom dizajnirane virusne čestice u kojima su genski elementi potrebni za patogenost i replikaciju uklonjeni i zamijenjeni transgenom od interesa. Virusi koji se mogu replicirati nisu poželjni za ljudsku gensku terapiju zato što ubijaju stanice od interesa te se integriraju u više mjesta u domaćinskom kromosomu, što može aktivirati staničnu onkogenezu. Zbog toga se koriste dijelovi virusa tako da su virusi onesposobljeni generirati potpune virusne kopije samih sebe dok nose gen od interesa u stanicu i integriraju se u kromosomsku DNA. Takvi virusi koji se ne mogu replicirati nazivaju se pseudovirusi. Defektni virusi se stvaraju u stanicama za pakiranje gdje su geni koji proizvode potrebne virusne proteine (*gag*, *pol*, *env* i gen za integrazu) dodani u stanice tkivne kulture na odvojenim plazmidima. Produkcija virusnih proteina u stanicama za pakiranje dovodi do formacije praznih virusnih čestica bez DNA ili RNA materijala. Ciljana DNA se dodaje u takve stanice za pakiranje i nastaju producirajuće stanice, a nukleotidne sekvencije dodane DNA su jedine koje se integriraju u domaćinski kromosom. Ovakvi defektni virusi ne mogu se reproducirati nakon što ugrade genski materijal u kromosom jer se komponente potrebne za produkciju intaktnog virusa nalaze na odvojenim plazmidima (Bank 2010, Chandrakasan i Malik 2014).

Prvi vektori korišteni u genskoj terapiji kod hemoglobinopatija su retrovirusni vektori. Imaju intaktna virusna duga terminalna ponavljanja (LTR, od eng. *long terminal repeats*) i posjeduju visoku razinu transgene ekspresije, ali imaju određena ograničenja. Retrovirusni vektori ne mogu inficirati HSC koje se ne dijele, često uzrokuju hematopoetske maligne bolesti zbog neprecizne ugradnje blizu staničnih protoonkogenata i ne mogu nositi veliku količinu genskoga materijala. Iako su mnogobrojne modifikacije napravljene u gama-retrovirusnim vektorima, što je rezultiralo poboljšanom genskom ekspresijom, pravi napredak u genskoj terapiji se dogodio korištenjem lentivirusnih vektora. Lentivirusni vektori pokazuju nekoliko prednosti naspram dotad korištenih retrovirusa. Imaju sposobnost da uđu u intaktnu jezgru i integriraju se u stanicu koja se ne dijeli, što je za HSC pogodnije s obzirom na to da

su dugoročne HSC češće u mirovanju. Pokazuju visoku efikasnost transdukcije i mogu nositi veće i kompleksnije transgene kazete s intronima i regulacijskim elementima, što je potrebno za visoku razinu ekspresije globinskih gena. Također, imaju sigurniji integracijski profil jer se najčešće ugrađuju unutar introna staničnog gena izbjegavajući regulacijske elemente blizu mjesta početka transkripcije, što rezultira nižom genotoksičnošću i smanjenjem učestalosti insercijske onkogeneze. Sigurnost je povećana i dizajniranjem samoinaktivirajućih (SIN, od eng. *self-inactivating*) vektora. SIN-lentivirusni vektori imaju deleciju u virusnom promotoru/pojačivaču u regiji U3 LTR-a na 3'-kraju. Ta delecija se prilikom transkripcije kopira u 5'-LTR i smanjuje transaktivaciju susjednih promotora, što čini vektor sigurnijim za korištenje u terapijske svrhe (Chandrakasan i Malik 2014, Goodman i Malik 2016).

Što se tiče samog transgena koji se dostavlja vektorom u stanice, on uvodi ili dodatnu kopiju endogenog globinskog gena ili globinskog gena dizajniranog tako da ublažava efekte bolesti. Tako dizajnirani transgeni često koriste prirodne polimorfizme koji su pokazali da reduciraju simptome srpaste anemije ili talasemije. Primjeri takvih polimorfizama su oni koji umanjuju normalno razvojno prebacivanje s ekspresije γ -globina na ekspresiju β -globina (Goodman i Malik 2016). Budući da su za visoku ekspresiju β -globinskog gena ključni regulacijski elementi koji se nalaze u LCR-u, transgeni osim globinskog gena sadrže i elemente HS2, HS3 i HS4 kako bi se transgena kazeta smjestila u retrovirusni odnosno lentivirusni vektor. Osim o regulacijskim elementima velika varijacija u ekspresiji gena ovisi i o mjestu integracije tj. pozicijskom efektu kromatina. To je dovelo do otkrića izolacijskih elemenata kromatina kao što su hipersenzitivna mjesta 4 kokoši (cHS4). Izolatori su granični elementi smješteni bočno do genskog klastera od interesa, oni štite transgen od utišavanja, rezultiraju ekspresijom neovisnoj o poziciji i imaju aktivnost koja blokira pojačivače (Chandrakasan i Malik 2014).

Tablica 1. Usporedba virusnih vektora koji se koriste u genskoj terapiji kod hemoglobinopatija (Chandrakasan i Malik 2014).

Svojstva virusnih vektora koji se koriste u genskoj terapiji kod hemoglobinopatija			
	Retorvirusni gama- vektori	Lentivirusni vektori	Pjenasti virusni vektori

Porodica	Retroviridae	Retroviridae	Retroviridae
Virusni genom	RNA	RNA	RNA → cDNA
Patogenost	Dobiven iz patogenog mišjeg virusa leukemije	Dobiven iz patogenog virusa HIV	Dobiven iz nepatogenog pjenastog virusa
Potreba za diobom stanice	Da	Ne	Da
Ograničenje pakiranja	Do 5 Kb, nestabilan s velikim transgenim kazetama	Do 7 Kb	Do 9 Kb, velike transgene kazete
Efikasnost transdukcije	Velika u stanicama koje se dijele	Velika u stanicama koje se dijele i ne dijele	Efikasan ulazak u stanice koje se dijele i ne dijele, no integracija se odvija u stanicama koje se dijele
Mjesto integracije	Preferentno blizu transkripcijskog mjesta (60% - 70%)	Preferentno unutar transkribirajućih gena (60% - 70%)	Preferira se integracija u negenske regije u približno 60% slučajeva. No, kod integracija koje se događaju u regijama bogatim genima preferira se ugradnja blizu transkripcijskog mjesta.
Sigurnost u kliničkim ispitivanjima	Pojava leukemije kod pacijenata u kliničkim ispitivanjima genske terapije kod X-vezane teške kombinirane imnodeficiencije i Wiskott-Aldrichovog sindroma Pojava mijelodisplazije s monosomijom 7 kod pacijenata u kliničkim ispitivanjima genske terapije kod kronične granulomatozne bolesti	Nema očitih malignih pojava nakon 2-6 godina Klonalna ekspanzija HMGA2 (od eng. <i>high mobility group AT-hook 2</i>) gena u jednom pacijentu s talasemijom koja se kasnije smanjila	Nema kliničkih podataka
Eksperimentalni podaci o genotoksičnosti	Visok rizik od insercijske mutageneze	Sigurniji od RV. Visoka sigurnost sa samoinaktivirajućim dizajnom i korištenjem staničnih promotora i pojačivača	Sigurniji integracijski profil od retrovirusnih i lentivirusnih vektora.
Glavne prednosti	Najdulji podaci i iskustvo kod ljudi	Sigurniji od RV Stabilno može nositi veći	Nepatogen, može nositi veliki teret i možda je

	SIN RV vektorski dizajn može umanjiti sigurnosne brige	transgen Efikasno transducira HSC koje se ne dijele	sigurniji od RV i LV
Glavni nedostaci	Klinički značajan rizik od insercijske onkogeneze Nizak kapacitet Ne transducira stanice koje se ne dijele	Možda inducira disregulaciju/prekid staničnih gena iako u niskim frekvencijama	Još se ne koristi u kliničkim istraživanjima kod ljudi

3.2. Klinička istraživanja

Prva uspješna genska terapija provedena je za β^E/β^0 -talasemiju u Lipnju 2007. godine. Polovica pacijenata koja boluje od ovog tipa talasemije su ovisni o transfuziji. Ista grupa je u Lipnju 2015. godine provela uspješnu gensku terapiju za jednog pacijenta s ozbiljnom srpastom anemijom i tri pacijenta s β -talasemijom major koristeći isti β -globin eksprimirajući vektor, Lentiglobin BB305 (Cavazzana i sur. 2015, Cavazzana-Calvo i sur. 2010). Lentiglobin BB305 je korišten i u kliničkom istraživanju u kojem je provedena prva uspješna genska terapija na pacijentu koji boluje od srpaste anemije (β^S/β^S genotip). Lentiglobin BB305 je SIN vektor s dvije kopije cHS4 izolatora od 250 pb ugrađenih u U3 regiju, sadrži promotore i kritične elemente LCR ljudskog β -globinskog gena. Kodira za mutirani adultni β -globin tako da je mutirana jedna aminokiselina u poziciji 87 β -globinske sekvence. Hb β 87 se ponaša kao fetalni Hb i interferira s polimerizacijom srpastog Hb-a, a funkcionira normalno kao i HbA i u ekspresiji i u kapacitetu da prenosi kisik. Također, β -globin s opisanim svojstvima se lako može razlikovati od normalnog adultnog hemoglobina uz pomoć HPLC (od eng. *high performance liquid chromatography*) analize kod pacijenata koji primaju transfuziju eritrocita i kod pacijenata s β^+ -talasemijom. Kapacitet razlikovanja egzogenih od endogenih globinskih lanaca je bitan za evaluaciju efikasnosti ugradnje gena (Bank 2010, Cavazzana i sur. 2015, Cavazzana-Calvo i sur. 2010, Ribeil i sur. 2017).

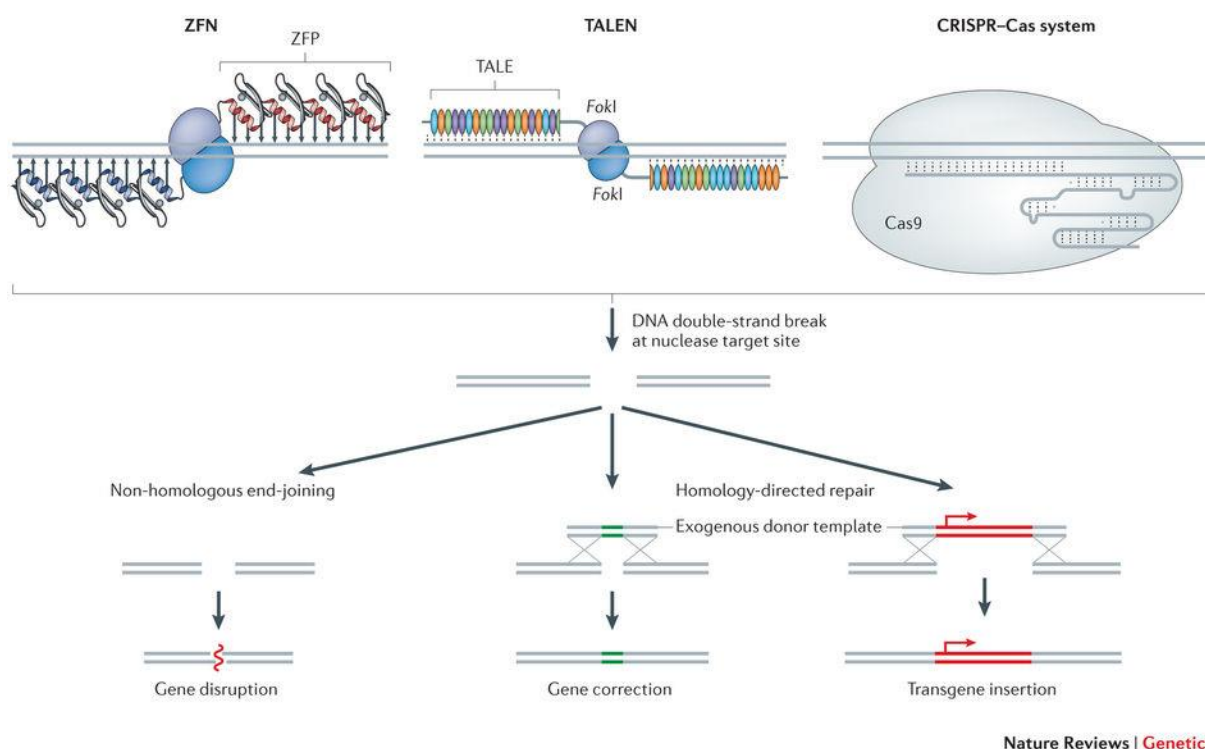
Pacijent s β^E/β^0 -talasemijom koji je gensku terapiju primio u lipnju 2007 godine i koji je do tada svaki mjesec morao primati transfuziju, 21 mjesec nakon primljene terapije postaje neovisan o transfuziji s krvnim Hb održanim između 9 i 10 g/dL od čega jedna trećina sadrži

vektorom kodiran β -globin. Analizom insercijskih mjesta (IS, od eng. *integration sites*) vektora pokazano je da većina terapijskog doprinosa potječe od dominantnog mijeloid pristranog klona u kojem je integrirani vektor uzrokovao transkripcijsku aktivaciju HMGA2 gena u eritroidnim stanicama s daljnjom povećanom ekspresijom necjelovite HMGA2 mRNA neosjetljive na razgradnju od strane let-7 miRNA. HMGA2 gen kodira za protein koji pripada nehistskoj kromosomskoj HMG (od eng. *high mobility group*) porodici proteina i sadrži DNA vezujuće domene, stoga djeluje kao transkripcijski faktor. Značajno odstupanje od poliklonalne distribucije izložene HMGA2 IS klonu je ili posljedica stohastičkog događaja zbog niskog inicijalnog broja transduciranih HSC-a ili zbog diferencijalne produkcije mijeloid pristrane hematopoeze okinute od strane disregulirane ekspresije HMGA2 u uzvodnim progenitorima. Prisutnost HMGA2 insercijskih mjesta u sličnim proporcijama među eritroblastima, granulocitnim monocitima i LTC-ICs podskupovima dovodi do prijedloga da je hematopoeza koja dolazi od transdukcijskog klona inicijalne stanice kod ovog pacijenta mijeloid pristrana. (Cavazzana-Calvo i sur. 2010, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8091>). Što se tiče genske terapije primijenjene na 4 druga pacijenta od strane iste grupe u lipnju 2015. godine, pacijent s ozbiljnom srpastom anemijom 9 mjeseci nakon terapije sadržavao je 51.5% Hb-a koji nisu srpastog oblika od čega 48% sadrži vektorom kodirani β -globin. Dva pacijenta s β^E/β^0 -talasemijom pokazuju konzistentnu ekspresiju $\beta A-T87Q$ globina i nisu ovisni o transfuziji ni 15 mjeseci nakon terapije. β^0/β^0 pacijent imao je samo jednu naknadnu infuziju lijekom jedan mjesec nakon terapije. Ni kod jednog od pacijenata nije bilo štetnih događaja povezanih s transduciranim matičnim stanicama (Cavazzana i sur. 2015). U kliničkom istraživanju u kojem je pacijent sa srpastom anemijom tretiran genskom terapijom u listopadu 2014. godine pokazalo se da je 15 mjeseci nakon tretmana razina terapijskog β -globina ostala visoka te nije bilo štetnih događaja povezanih s transduciranim matičnim stanicama kao ni kliničkih događaja i hospitalizacije povezane s bolešću (Ribeil i sur. 2017.). U posljednja dva istraživanja analize insercijskih mjesta vektora pokazali su konzistentni poliklonalni profil bez detekcije dominantnog klona (Cavazzana i sur. 2015, Ribeil i sur. 2017).

3.3. Uređivanje globinskih gena i globinskih regulacijskih elemenata

Kada govorimo u uređivanju gena, ono se oslanja na prijelaznu intervenciju *ex vivo* i ne rezultira trajnom insercijom strane DNA u genom. Uglavnom se temelji na korekciji β -globinskog gena ili uređivanju β -globinskih regulacijskih elemenata s ciljem ublažavanja fenotipa bolesti. Korekcija specifična za mjesto mutiranih β -globinskih gena zahtjeva prijelaznu dostavu nukleaza i kalupa za popravak kako bi se postigla korekcija. Kako raste razumijevanje mehanizama razvojne regulacije globinskih gena, tako dolazi do razvoja alternativnih strategija koje uključuju prekid gena radije nego popravak (Hoban i sur. 2016).

Putem dizajnerskih nukleaza moguće je razviti precizne genomske modifikacije koje ovisno o sustavu koji ih dostavlja mogu izbjeći nespecifičnu integraciju i značajno reducirati insercijsku onkogenezu. One nose određene rizike kao što su moguća DNA oštećenja u nekom drugom dijelu genoma tzv. *off-target* oštećenja. Danas se koriste tri dizajnerske nukleaze: ZFN (od eng. *Zinc Finger nucleases*), TALEN (od eng. *transcription activator-like effector nucleases*) i CRISPR/Cas (od eng. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein*) sustav (Slika 2.). ZFN su od strane korisnika definirane domene cinkovih prstiju za prepoznavanje specifične DNA sekvence i nespecifične FokI katalitičke domene za cijepanje DNA. Dvije ZFN se vežu za suprotne lance ciljane DNA sekvence, što dovodi do dimerizacije FokI nukleaze i aktivacije nukleazne aktivnosti. TALEN su višebrojne domene koje vežu DNA organizirane u tandemska ponavljanja koja su vezana za FokI katalitičku domenu. Potrebno je dizajnirati dva takva tandemska ponavljanja domena koje vežu DNA koja će se vezati za suprotne lance DNA i dopustiti FokI dimerizaciju. Svaka domena za vezanje sadrži dvije definirane aminokiseline koje su sposobne prepoznati specifičan par baza. CRISPR-cas sustav sastoji se od vodeće RNA (od eng. *guide RNA*) i proteina Cas koji zajedno stvaraju ribonukleoproteinski kompleks koji usmjerava protein na ciljanu lokaciju u genomu. Sve tri dizajnerske nukleaze uvode dvolančane lomove na preciznim lokacijama u genomu koji se zatim popravljaju ili nehomolognim spajanjem krajeva (NHEJ, od eng. *nonhomologous end joining*) ili homolognom rekombinacijom (HR, od eng. *homologous recombination*) ako se osigura kalup za popravak. NHEJ je mehanizam popravka koji je sklon pogreškama i najčešće uvodi delecije ili insercije koje, ako se dogode unutar kodirajuće sekvence, uzrokuju mutacije pomaka okvira čitanja koje dovode do sinteze necjelovitog proteina ili degradacije mRNA (Goodman i Malik 2016).



Slika 2. Usporedba ZFN, TALEN, i CRISPR/Cas sustava. (Yin i sur. 2014)

Frekvencija genske korekcije koristeći HSC je preniska da bi bila klinički korisna. HSC su limitirane u broju i ne mogu se uzgojiti u velikim količinama u kulturi, zato što radije diferenciraju u zrelije oblike krvnih stanica nego što se dijele simetričnom diobom. Također, genska korekcija je rijedak događaj i treba se analizirati i izolirati velik broj individualnih stanica kako bi se dobio dovoljan broj stanica s ispravljenim genom. Za rješavanje ovog problema važno je otkriće da se ljudske kao i mišje embrijske matične stanice mogu izolirati iz kožnih stanica. Ugradnja i ekspresija četiri različita gena (*Klf4*, *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*) je dovoljna kako bi diferencirane kožne stanice dobile potrebne karakteristike embrijskih matičnih stanica. Takve stanice se zovu inducirane pluripotentne matične stanice (iPSC, od eng. *induced pluripotent stem cells*). Pokazano je da se mišje iPSC dobivene iz kožnih stanica mogu koristiti kako bi izliječile mišji model za ljudsku srpastu anemiju. Kožne stanice su konvertirane u iPSC ugradnjom 4 gore navedena gena, a zatim je u njih elektroporacijom ubačena kratka sekvenca DNA β -globinskog gena koja sadrži sekvence potrebne za korekciju mutacije putem HR. Stanice su zatim uzgojene u velikim količinama. Rijetke iPSC u kojima

je došlo do ispravljanja mutacije su izolirane i uzgojene u većim količinama te su na kraju uzgajane na OP-9 stromalnoj staničnoj liniji iz koštane srži i tretirane s faktorima rasta i mijeloidnim citokinima kako bi postale HSC. Takve HSC su transplantirane nazad u miša kod kojeg su dovele do izliječenja srpaste anemije. Postoje određene prepreke koje se moraju prijeći kako bi se ljudske iPSC mogle koristiti u terapijske svrhe. Naime, potrebno je pronaći način kako bi se zaobišlo korištenje štetnih onkogeni (kao što je *c-Myc*) kao dio transkripcijskih faktora potrebnih za pretvaranje kožnih stanica u iPSC, izbjeci upotrebu retrovirusnih vektora kao mehanizma dostave gena koji nose rizik od insercijske mutageneze i razviti pouzdane protokole za diferencijaciju ljudskih iPSC. Ovakav pristup ipak donosi veliku prednost jer nudi mogućnost pretraživanja i odabiranja idealnog klona sa sigurnom integracijom i visokim transgenim ekspresijskim profilom te nema imunoloških barijera jer su kožne stanice uzete iz samog pacijenta (Bank 2010, Hanna i sur. 2007). Osim što je teško uzgojiti HSC u kulturi, razlog zašto se korekcija β -globinskog gena ne koristi još u terapijske svrhe je i niska frekvencija poželjnih HR događaja koja je također posljedica toga što su HSC stanice koje se rijetko dijele. Mehanizam popravka HR-om je ograničen na S- i G2-fazu staničnog ciklusa i stoga HSC kao uglavnom mirujuće stanice radije koriste NHEJ put popravka u slučaju dvolančanih lomova (Hoban i sur. 2016).

Trenutne studije su ograničene na primjenu tehnika uređivanja gena u miševima i u ljudskim stanicama u kulturi. Tako su u jednoj studiji uspjeli uz pomoć ZFN efikasno uvesti dvolančane lomove u β -globinskom lokusu s minimalnim mutacijama van ciljanog mjesta u genomu te uz dostavljanje homolognog donorskog kalupa postići visoku razinu genske modifikacije u CD34⁺ HSC i progenitorskim stanicama. Tako modificirane CD34⁺ stanice su pokazale sposobnost da diferenciraju u eritroidne, mijeloidne i limfoidne stanične tipove *in vitro* i *in vivo* kada su bile presađene u imunodeficientnog miša. Također, postignuta je i ciljana genska korekcija mutacije u CD34⁺ stanicama izoliranih iz koštane srži pacijenta sa srpastom anemijom koja je dovela do produkcije divljeg tipa hemoglobina (HbA) (Hoban i sur. 2015). U drugoj su studiji, usporedbom ZFN, TALEN i CRISPR/Cas sustava i njihove sposobnosti da modificiraju β -globinski lokus, pokazali da je CRISPR/Cas sustav najefikasniji (Goodman i Malik 2016, Huang i sur. 2015).

Budući da je jedan od pristupa umanjivanje fenotipa β -globinskih mutacija povećanjem produkcije HbF-a, koriste se mehanizmi kojima je regulirana transkripcija β -globinskih gena

(Goodman i Malik 2016). Pritom je od velike važnosti otkriće transkripcijskog faktora BCL11A. BCL11A je primarno eksprimiran u hematopoetskim stanicama odraslih gdje formira remodelirajući kompleks kromatina koji suprimira ekspresiju γ -globina (Bank 2010). Utišavanje BCL11A je jedan od načina na koji se pokušava povećati ekspresija HbF-a. U jednoj studiji to je postignuto pomoću RNA-interferencije putem kratke RNA ukosnice (shRNA, od eng. *short hairpin RNA*). Korišten je lentivirusni vektor koji sadrži shRNA ugrađenu u miRNA (od eng. *micro RNA*) okosnicu koja je pod kontrolom promotora RNA polimeraze II. Koristeći takvu shRNA^{miR} (od eng. *miRNA adapted shRNA*) razine HbF-a su se povećale i više od 50% u odnosu na ukupni Hb u primarnim eritroidnim stanicama dobivenim iz transduciranih CD34⁺ HSC i progenitorskih stanica (Guda i sur. 2015). No, BCL11A ima važnu ulogu u razvoju B-stanica i dendritičkih stanica, stoga bi njegovo potpuno onemogućivanje funkcije moglo smetati produkciji imunskih stanica. Intronski eritroidni pojačivač specifičan za BCL11A je potreban za eritroidnu ekspresiju BCL11A i utišavanje fetalnog globinskog gena. Pokazalo se da delecija ovog pojačivača pomoću CRISPR/Cas9 sustava u primarnim eritrocinim prekursorima rezultira znatnom HbF indukcijom. Genske varijacije koje se prirodno događaju kod tog pojačivača se toleriraju i povezane su s različitim razinama HbF-a kao i s ozbiljnošću β -hemoglobinskih poremećaja te se smatra kako bi se prekidom pojačivača mogli ublažiti nedostaci potpunog gubitka BCL11A (Canver i sur. 2015, Hoban i sur. 2016). Jedan od pristupa u povećanju razine fetalnog hemoglobina jest i stvaranje sintetskih transkripcijskih faktora. U jednoj studiji su inducirali petlju LCR-promotora povezujući samopovezujuću (SA, od eng. *self-association*) domenu Ldb1 s β -globinskim promotorom pomoću umjetnih cinkovih prstiju. Usmjeravanjem domene SA Ldb1 ka razvojno utišanim embrijskim globinskim genima u mišjim eritroblastima potiče se transkripcijska reaktivacija koja ovisi o LCR. Usmjeravanje domene SA Ldb1 ka fetalnom γ -globinskom promotoru u primarnim eritroblastima čovjeka povećava kontakt između γ -globinskog promotora i LCR-a, što stimulira transkripciju γ -globina s recipročnom redukcijom u ekspresiji β -globina. Sinteza γ -globina čini 85% ukupne globinske sinteze (odnosi se na ukupnu sintezu γ -globina i β -globina). Ovom studijom se pokazalo da petlja kromatina ima esencijalnu ulogu u kontroli globinske promjene i tako je predložena moguća strategija za liječenje hemoglobinopatija (Deng i sur. 2014, Hoban i sur. 2016).

4. Zaključak

Ugradnja globinskih gena putem virusnih vektora pokazala se kao uspješan pristup u izlječenju srpaste anemije i talasemije. Kod pacijenata s β^E/β^0 -talasemijom, β -talasemijom major i srpastom anemijom ovaj tip genske terapije pokazao se uspješnim, ali potreban je dulji vremenski period kako bi se utvrdilo da li je terapija zaista rezultirala dugoročnim izlječenjem i da li je dovela do nuspojava. Iako uređivanje globinskih gena i globinskih regulacijskih elemenata još nije primijenjeno na ljudima, rezultati velikog broja istraživanja pokazuju da bi se u budućnosti ovaj tip genske terapije mogao koristiti u liječenju. Naime, i kod jednog i kod drugog pristupa postoji još puno prepreka koje se moraju prijeći i koje zahtijevaju puno istraživanja. Za razliku od alogenske transplantacije HSC-a koja je jedini način izlječenja srpaste anemije i talasemija, genska terapija ne zahtijeva postojanje odgovarajućeg donora, stoga bi se njezinim razvitkom omogućilo dugoročno izlječenje većem broju oboljelih za koje zasada postoje samo tretmani koji ublažavaju simptome bolesti, ali ne predstavljaju dugoročno rješenje.

5. Literatura

- Bank, A. (2010). Hemoglobin Gene Therapy for β -Thalassemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 24, 1187-1201.
- Blaese, R., Culver, K., Miller, A., Carter, C., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J., Rosenberg, S., Klein, H., Berger, M., Mullen, C., Ramsey, W., Muul, L., Morgan, R. and Anderson, W. (1995). T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA- SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science*, 270, 475-480.
- Canver, M., Smith, E., Sher, F., Pinello, L., Sanjana, N., Shalem, O., Chen, D., Schupp, P., Vinjamur, D., Garcia, S., Luc, S., Kurita, R., Nakamura, Y., Fujiwara, Y., Maeda, T., Yuan, G., Zhang, F., Orkin, S. and Bauer, D. (2015). BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. *Nature*, 527, 192-197.
- Cavazzana, M., Ribell, J., Payen, E., Suarez, F., Beuzard, Y., Touzot, F., Cavallesco, R., Lefrere, F., Chretien, S., Bourget, P., Monpoux, F., Pondarre, C., Neven, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Kuypres, F., Sandler, L., Soni, S., Hermine, O., Blanche, S., De Montalemebert, M., Hacie-Bey-Abina, S. and Leboulch, P. (2015). Outcomes of Gene Therapy for Severe Sickle Disease and Beta-Thalassemia Major Via Transplantation of Autologous Hematopoietic Stem Cells Transduced Ex Vivo with a Lentiviral Beta AT87Q-Globin Vector. *Blood*, 126, 202.
- Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., Down, J., Denaro, M., Brady, T., Westerman, K., Cavallesco, R., Gillet-Legrand, B., Caccavelli, L., Sgarra, R., Maouche-Chretien, L., Bernaudin, F., Girot, R., Dorazio, R., Mulder, G., Polack, A., Bank, A., Soulier, J., Larghero, J., Kabbara, N., Dalle, B., Gournel, B., Socie, G., Chretien, S., Cartier, N., Aubourg, P., Fischer, A., Cornetta, K., Galacteros, F., Beuzard, Y., Gluckman, E., Bushman, F., Hacie-Bey-Abina, S. and Leboulch, P. (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*, 467, 318-322.
- Chandrakasan, S. and Malik, P. (2014). Gene Therapy for Hemoglobinopathies. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 28, 199-216.

- Deng, W., Rupon, J., Krivega, I., Breda, L., Motta, I., Jahn, K., Reik, A., Gregory, P., Rivella, S., Dean, A. and Blobel, G. (2014). Reactivation of Developmentally Silenced Globin Genes by Forced Chromatin Looping. *Cell*, 158, 849-860.
- Ginn, S., Alexander, I., Edelstein, M., Abedi, M. and Wixon, J. (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *The Journal of Gene Medicine*, 15, 65-77.
- Goodman, M. and Malik, P. (2016). The potential of gene therapy approaches for the treatment of hemoglobinopathies: achievements and challenges. *Therapeutic Advances in Hematology*, 7, 302-315.
- Guda, S., Brendel, C., Renella, R., Du, P., Bauer, D., Canver, M., Grenier, J., Grimson, A., Kamran, S., Thornton, J., de Boer, H., Root, D., Milsom, M., Orkin, S., Gregory, R. and Williams, D. (2015). miRNA-embedded shRNAs for Lineage-specific BCL11A Knockdown and Hemoglobin F Induction. *Molecular Therapy*, 23, 1465-1474.
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C., Meissner, A., Cassady, J., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L., Townes, T. and Jaenisch, R. (2007). Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin. *Science*, 318, 1920-1923.
- Herzog, R., Cao, O. and Srivastava, A. (2010). Two Decades of Clinical Gene Therapy – Success Is Finally Mounting. *Discovery Medicine*, 9, 105-111.
- Hoban, M., Orkin, S. and Bauer, D. (2016). Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. *Blood*, 127, 839-848.
- Hoban, M., Cost, G., Mendel, M., Romero, Z., Kaufman, M., Joglekar, A., Ho, M., Lumaquin, D., Gray, D., Lill, G., Cooper, A., Urbinati, F., Senadheera, S., Zhu, A., Liu, P., Paschon, D., Zhang, L., Rebar, E., Wilber, A., Wang, X., Gregory, P., Holmes, M., Reik, A., Hollis, R. and Kohn, D. (2015). Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*, 125, 2597-2604.
- Huang, X., Wang, Y., Yan, W., Smith, C., Ye, Z., Wang, J., Gao, Y., Mendelsohn, L. and Cheng, L. (2017). Production of Gene-Corrected Adult Beta Globin Protein in Human

- Erythrocytes Differentiated from Patient iPSCs After Genome Editing of the Sickle Point Mutation. *Stem Cells*, 33, 1470-1479.
- Kohne, E. (2011). Hemoglobinopathies: Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment. *Deutsches Arzteblatt International*, 108, 532-40.
- Li, Q., Peterson, K., Fang, X. and Stamatoyannopoulos, G. (2002). Locus control regions. *Blood*, 100, 3077-3086.
- Mardešić D. (2003). *Pedijatrija*. 7 izd. Zagreb: Školska Knjiga, 651-655.
- Nelson, D., Cox, M. and Lehninger, A. (2013). *Lehninger, principles of biochemistry*. 6th ed. New York: Macmillan higher education, 159-163.
- Ribeil, J., Hacein-Bey-Abina, S., Payen, E., Magnani, A., Semeraro, M., Magrin, E., Caccavelli, L., Neven, B., Bourget, P., El Nemer, W., Bartolucci, P., Weber, L., Puy, H., Meritet, J., Grevent, D., Beuzard, Y., Chrétien, S., Lefebvre, T., Ross, R., Negre, O., Veres, G., Sandler, L., Soni, S., de Montalembert, M., Blanche, S., Leboulch, P. and Cavazzana, M. (2017). Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, 376, 848-855.
- Stamatoyannopoulos, G. (1972). The Molecular Basis of Hemoglobin Disease. *Annu.Rev.Genet.*, 6, 47-70.
- Yin, H., Kanasty, R., Eltoukhy, A., Vegas, A., Dorkin, J. and Anderson, D. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics*, 15, 541-555.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8091>

6. Sažetak

Hemoglobinopatije su jedne od najčešćih monogenских nasljednih bolesti na svijetu. Dije se na talasemije i bolesti strukturnih varijanti hemoglobina. U genskoj terapiji kod hemoglobinopatija razlikuju se dva osnovna pristupa: ugradnja globinskih gena i uređivanje globinskih gena i globinskih regulacijskih elemenata. Klinička istraživanja na ljudima su zasad ograničena na pristup ugradnje globinskih gena koji je kod pacijenata s β -talasemijom i srpastom anemijom pokazao pozitivne rezultate. Primjena uređivanja globinskih gena i globinskih regulacijskih elemenata je ograničena na istraživanja na miševima i ljudskim stanicama u kulturi, ali rezultati pokazuju njihovu moguću primjenu u liječenju. U ovom radu dan je kratak pregled osnovnih tehnika koje se koriste u spomenutim pristupima kao i rezultata studija i kliničkih istraživanja koja su dovela do njihovog napretka. Također, izloženi su nedostaci i prednosti oba pristupa te prepreke koje se moraju prijeći da bi genska terapija kao način liječenja hemoglobinopatija postala ostvariva.

7. Summary

Hemoglobinopathies are one of the most common inherited monogenic diseases in the world. Two main groups of hemoglobinopathies are thalassemia syndromes and structural hemoglobin variants. In gene therapy for the treatment of hemoglobinopathies there are two main approaches: globin gene addition and gene editing of globin gene and globin regulatory elements. For now, clinical trials on humans are limited on globin gene addition which showed positive results in patients with β -thalassemia and sickle cell anemia. Use of gene editing of globin gene and globin regulatory elements are limited on trials on murine models and human cells in culture. However, results show their possible application in therapeutic purposes. In this paper brief review of basic techniques that are used in both approaches is given as well as description of studies and clinical trials that led to their progress. The main advantages and disadvantages of both approaches and obstacles that must be overcome to make gene therapy the way of treatment for hemoglobinopathies achievable option are also discussed.